

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI

“FEDERICO II”

Dipartimento Universitario Di Scienze Biomediche Avanzate

Sezione di Chirurgia Generale



Dottorato di Ricerca in Scienze Biomorfologiche e Chirurgiche

TESI

**“MPM (Multiple Primary Malignancies): significato e prospettive terapeutiche
della localizzazione del gene Pten”**

Tutor

Prof.ssa Concetta Anna Dodaro

CANDIDATA

Dott.ssa Rossella Mastromarino

Anno accademico 2016-2017

INDICE

PARTE GENERALE

INTRODUZIONE	pag 4
MPM: GENERALITA'	pag 6
1.1 Definizione e Classificazione	pag 8
1.2 Epidemiologia	pag 11
CORRELAZIONI EZIOPATOGENETICHE	pag 18
2.1 Introduzione	pag 18
2.2 Fattori di Rischio Ambientale	pag 19
2.3 Fumo	pag 20
2.4 Dieta	pag 20
2.5 Genetica	pag 21
2.6 Correlazione Endocrina	pag 24
IL RUOLO DEI GENI NEI TUMORI	pag 26
3.1 Alterazioni genetiche classiche associate al carcinoma colon rettile	pag 27
3.2 Altre alterazioni geniche	pag 30
3.3 Il gene PTEN	pag 32

TUMORI EREDITARI e Gene Pten	pag 36
TARGETS MOLECOLARI E TRATTAMENTO DEL CARCINOMA COLO-RETTALE	pag 41
TERAPIA ANTI-EGFR: CETUXIMAB E PANITUMUMAB	pag 42
“CHIRURGIA DNA GUIDATA” esperienze nella FAP	pag 47
Bibliografia	pag 51

PARTE SPERIMENTALE

1.	Introduzione	pag 57
2.	Correlazione Genetica	pag 59
3.	Materiali e Metodi	pag 65
4.	Risultati	pag 67
5.	Discussione	pag 72
6.	Conclusione	pag 76
7.	Bibliografia	pag 77

INTRODUZIONE

La crescente attenzione circa le neoplasie maligne multiple (MPM) trova la sua origine nel lontano 1889 quando Billroth descrisse per la prima volta il caso di un paziente con un carcinoma gastrico sviluppatosi dopo la rimozione di un epiteloma spinocellulare dell'orecchio destro.

Negli ultimi anni I tumori multipli primitivi (MPM) rappresentano sempre più una un'entità interessante sia da un punto di vista clinico che biomolecolare.

L'incidenza delle MPM è in costante aumento , tale incremento è stato attribuito a diversi fattori come :

- Aumento dell'incidenza di diverse forme di cancro
 - L'allungamento della vita media , soprattutto nelle popolazioni occidentali
 - Tumori trattati in stadio precoce
 - Qualità del follow up oncologico
 - Buona prognosi della maggior parte delle neoplasie
- Gli MPM presentano alcune caratteristiche cliniche :
- Tumori maligni basati su criteri istopatologici
 - Topograficamente distinti senza connessione con la via sottomucosa o con alterazioni intraepiteliali (skip metastasi)
 - Il secondo tumore non è una metastasi del primo.

Sempre più spesso osserviamo pazienti che guariscono da un tumore maligno e/o pazienti che a 5 o più anni dal trattamento siano liberi da malattia.

Una parte di questi pazienti può sviluppare ulteriori neoplasie per motivi apparentemente casuali (ovvero al momento non comprensibili alla luce delle attuali conoscenze biomediche), o per fattori definiti: genetici, ambientali, ormonali, immunologici, iatrogeni (conseguenti alle stesse terapie oncologiche) o virali.

È sempre più affermato il concetto che il cancro è essenzialmente una malattia genetica ovvero determinata da una mutazione del genoma, che condiziona lo sviluppo di cloni di cellule a differenziarsi in maniera diversa rispetto all'originale.

Ne deriva un modello di sviluppo multistage (che coinvolge autosufficienza dai segnali di crescita, insensibilità agli inibitori dei fattori di crescita, assenza di apoptosi, neoangiogenesi, meno limiti al potenziale replicativo, alterazioni delle difese immunitarie, metastasi) i cui attori fondamentali sono oncogeni, oncosoppressori e geni riparatori del DNA che cooperano influenzandosi vicendevolmente in un processo a cascata.

MPM: GENERALITA'

Si definiscono tumori multipli maligni primitivi (multiple primary malignancies – MPM) due o più tumori maligni che insorgono in maniera indipendente nello stesso paziente (ad eccezione del basalioma cutaneo).

Sebbene in passato si ritenesse fossero un'evenienza di raro riscontro nella pratica clinica, grazie ai dati epidemiologici dei Registri Tumori degli ultimi anni, è stato invece evidenziato come sia sempre più frequente la diagnosi, durante il follow up di pazienti oncologici, di una nuova neoplasia, non correlata con il primo tumore (index tumor)¹. Le MPM hanno subito negli ultimi decenni un rapido incremento, trasformandosi quindi in un'importante realtà scientifica e clinica.

Questo fenomeno è la conseguenza di diversi possibili fattori, tra cui:

- ❗ Incremento numerico dei tumori;
- ❗ Allungamento della vita media;
- ❗ La diagnosi precoce dei tumori per il miglioramento della prevenzione e degli strumenti diagnostici;
- ❗ L'efficacia crescente delle terapie medico-chirurgiche integrate;
- ❗ L'aumentata suscettibilità al cancro del paziente oncologico, legata alla predisposizione genetica, a fattori

di rischio ambientale e, talvolta, a terapie immunosoppressive.

Presso l'Area Funzionale di “Chirurgia Generale ad Indirizzo Addominale”, diretta dal Prof. Andrea Renda, disponiamo di un'ampia casistica di sindromi multitumorali, in particolare di quelle con interessamento del colon e del retto. Il tumore coloretale, si colloca come terza neoplasia tra le più frequenti in Italia nell'ambito delle MPM, dopo il tumore della cute e della mammella, come evidenziato dai dati dell' AIRTUM (Tab.1)²⁻⁴.

Tab. 1: Distribuzione di secondo tumore in base all'index tumor (AIRTUM 2013)

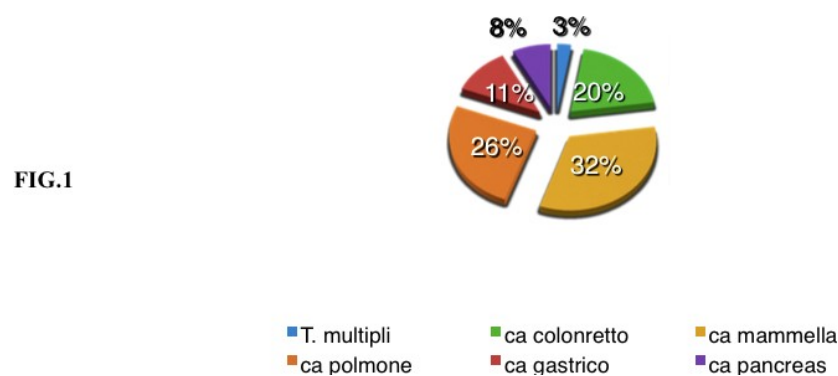
INDEX TUMOR	OBSERVED	O/E
All sites excluding skin melanoma	85.399	1.09*
Stomach	3.335	0.95
Colon	8.231	0.96*
Rectum	3.677	0.88*
Liver and bile ducts	822	0.85*
Lung	3.964	1.09*
Melanoma	2.125	1.08
Breast	10.818	1.11*
Ovary	853	1.18*
Prostate	10.956	0.93*
Testis	246	1.24*

O/E: rapporto casi osservati/casi attesi, * statisticamente significativi (p <0.05)

1.1 Definizione e Classificazione

Come già detto, è stato solo negli ultimi anni che si è posta maggiore attenzione alle MPM; per cui, a fronte di un'ampia letteratura esistente per le neoplasie isolate, si ritrovano pochi studi incentrati sulle MPM (Fig. 1), che restano quindi un'entità nosografica molto ampia e ancora poco definita.

In questa categoria sono incluse, infatti, molte associazioni tumorali, alcune ben codificate, altre meno ⁵.



Oltre che dal punto di vista quantitativo, anche da quello qualitativo le pubblicazioni sulle MPM sono senza dubbio di minor valore scientifico, data la prevalenza di case report e review (Fig.2).

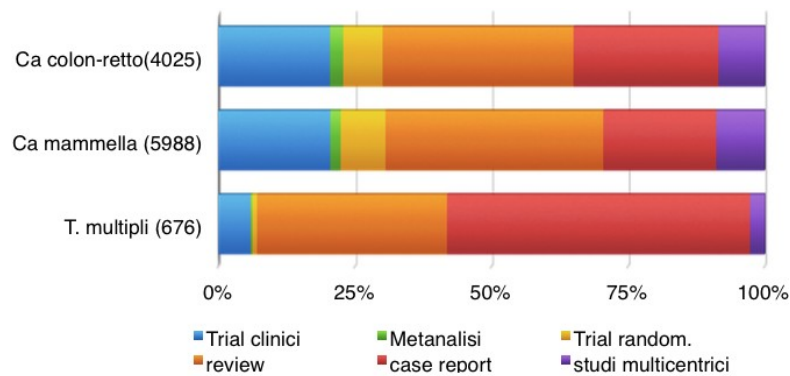


FIG.2

A questo proposito, non può non essere nominata la revisione effettuata dall'oncologo Charles Moertel nel 1977, pubblicata su "Cancer", in cui l'autore si sofferma soprattutto sulla definizione e sulla classificazione ⁶.

Già nel 1889, Billroth descriveva la prima associazione tumorale (epitelioma del padiglione auricolare con carcinoma gastrico) e aveva elaborato una prima definizione di MPM "*neoplasie ad insorgenza in organi e visceri diversi con proprie e ben distinte caratteristiche anatomo-patologiche e con eventuali metastasi proprie*".

Warren e Gates poi, nel 1932, cercarono di definire in maniera più scientifica le MPM introducendo dei veri e propri criteri ⁷:

- 1) ognuno dei tumori deve presentare un definito aspetto di malignità;
- 2) ognuno dei tumori deve essere istologicamente distinto e separato dagli altri da almeno 5 cm di tessuto sano;

3) la probabilità che uno sia la lesione metastatica dell'altro deve essere esclusa.

Secondo Moertel, questi criteri, anche se abbastanza ragionevoli, sono di non facile applicazione clinica.

Nel 1977 Moertel propose quindi una nuova classificazione di pazienti con MPM (Tab. 2).

Tab. 2: Classificazione di M.P.M. (Moertel – 1977)

1) Multiple Primary Malignant Neoplasms of multicentric origin.

- a) The same tissue and organ.
- b) A common contiguous tissue shared by different organs.
- c) The same tissue in bilaterally paired organs.

2) Multiple Primary Malignant neoplasms of different tissues or organs.

3) Multiple Primary Malignant neoplasms of multicentric origin plus a lesion(s) of a different tissue or organ.

La prima più ampia categoria è quella dei cancro multicentrici. In questo raggruppamento sono inclusi:

1) pazienti con due o più tumori primari dello stesso tessuto e/o organo.

2) cancro multipli dello stesso tessuto condiviso da organi contigui.

3) cancro multipli di organi pari bilateralmente.

La seconda grande categoria è quella dei cancro multipli di differenti tessuti e/o organi.

La terza categoria combina le prime due.

L'ultima definizione e classificazione delle MPM risale tuttavia al 2009 ed è stata proposta dal Prof. Andrea Renda nella monografia biennale SIC, edita da Springer (*Multiple primary malignancies*).

Secondo l'Autore dell'opera, si definiscono MPM : “*due o più tumori primitivi maligni insorgenti nello stesso paziente (eccetto il basalioma cutaneo). I tumori multifocali (ad es. il carcinoma epatocellulare) sono considerati un singolo evento neoplastico, mentre la FAP, con o senza carcinoma colo-rettale alla diagnosi, dovrebbe in ogni caso essere considerata un tumore maligno*”.

1.2 Epidemiologia

Attualmente le sindromi da MPM sono sempre più oggetto di interesse scientifico, grazie ai recenti sviluppi nel trattamento e all'aumento della sopravvivenza dei pazienti affetti da tali tumori.

Si ritiene che la maggiore sopravvivenza a lungo termine dei pazienti, così come l'aumentata tossicità dei farmaci inclusi negli attuali regimi terapeutici, siano i principali fattori che hanno portato ad un aumento della diagnosi di “seconde prime neoplasie”.

La frequenza delle MPM dipende da vari fattori ⁸:

- ❗ Lunghezza del follow-up;
- ❗ Suscettibilità genetica individuale;
- ❗ Esposizione a fattori ambientali;
- ❗ Accuratezza diagnostica;
- ❗ Trattamento somministrato.

L'incidenza clinica delle MPM, è compresa tra l'1,8% ed il 6% di tutti i tumori maligni, così come si evince dallo studio delle casistiche maggiori. La valutazione del fenomeno è oggi più attendibile grazie alla presenza dei Registri Tumori che hanno sostituito i lavori di singoli gruppi e la review (Tab.3-4) che venivano utilizzati in passato per la raccolta di dati epidemiologici ⁹⁻¹¹.

Tab. 3: Incidenza delle MPM

AUTORE	TUMORI MALIGNI	M.P.M. (%)
Fouvet (1964)	138.280	3,4
Feremans (1996)	33.754	2,9
Abbes (1968)	13.141	1,8
Ley (1981)	9.329	5,1
Demaille (1971)	2.462	4,1
Biscottini (1972)	595	2,2
Vaud Cancer Registry (1993)	34.615	6,01
Prosperi-Porta (1995)	2.108	1,99
TOTALE	234.000	27,5

Tab. 4: Incidenza doppi e tripli tumori

TIPI DI TUMORE	N° CASI	%
Doppi	1.835	94,9
Tripli	88	4,5
Quadrupli	8	0,4
Quintupli	3	0,2

I Registri Tumori di maggiore interesse per il numero di casi riportati sono: AIRTUM, EUROCARE e SEER.

1. Il data-base AIRTUM, compilato dall'Istituto Superiore di Sanità in Roma, consiste di tutti i dati di tumore collezionati da ogni Registro accreditato in Italia. E' il più grande archivio italiano e correntemente contiene informazioni su più di un milione di pazienti neoplastici (1.389.425 tumori maligni diagnosticati tra il 1978 e il

2003) e oltre mezzo milione di morti cancro-correlate (520.440 morti verificatesi nello stesso periodo). Sfortunatamente la copertura del Registro non è omogenea in tutta Italia. Nel 2008 sono stati registrati 1.291.585 pazienti con singolo tumore, 90.391 con doppio tumore e 6.909 pazienti con 3 tumori.

2. Il progetto EUROCARE include informazioni su 3.000.000 di casi di tumori incidenti nella popolazione residente nell'Europa occidentale e in due Paesi dell'Europa orientale durante il periodo '95-'99. Di questi, 170.000 (5,6%) erano MPM. La loro proporzione oscillava tra il 2% nel Registro fiammingo e l'11,8% nel Registro norvegese.

3. Il programma SEER rappresenta il data-base più attendibile, grazie al grande numero di casi registrati, al lungo follow-up dei sopravvissuti al cancro e al campione ampiamente rappresentativo che copre più del 26% della popolazione degli Stati Uniti.

Nel SEER i rischi del secondo cancro sono sistematicamente esaminati per sesso, età alla diagnosi del primo tumore e tempo trascorso dalla diagnosi, come anche il trattamento iniziale e il tipo istologico di certi tumori. Quando sono rilevanti, le differenze nel rischio di secondo tumore sono notate anche per il gruppo razziale.

In generale, i sopravvissuti ad un cancro hanno un rischio più alto del 14% di sviluppare una nuova neoplasia rispetto a quanto è atteso nella popolazione generale SEER.

Questi database consentono di rilevare numerose considerazioni epidemiologiche riguardo le MPM, in particolare a tale scopo risulta maggiormente importante il SEER, superiore agli altri due per rilevanza ed attendibilità. Ad esempio è stato osservato che l'età di diagnosi del primo evento neoplastico influenza notevolmente il rischio di sviluppare secondi tumori (Tab. 5), tale rischio, infatti, è aumentato di sei volte in pazienti sopravvissuti a tumori sviluppati in età infantile. Questa scoperta è coerente con studi precedenti sui tumori infantili, che analizzavano gli effetti delle terapie somministrate e l'eventuale suscettibilità genetica nello sviluppo di nuove neoplasie.

Il rischio di sviluppare un nuovo tumore per i pazienti con prima diagnosi tra i 18 e i 39 anni è di 2-3 volte più elevato; con l'avanzare dell'età tende ad uniformarsi con quello della media; per età molto avanzate risulta addirittura inferiore a quello atteso ¹².

Tab. 5:Rischio di secondo tumore primitivo dopo un qualsiasi primo tumore, per età alla diagnosi iniziale (SEER 1973-2000)

AGE	OBSERVED	TOTAL O/E	EAR
All ages	185,407	1.14	21
00-17 years	351	6.13	15
18-29 years	1,401	2.92	22
30-39 years	4,909	2.37	39
40-49 years	13,537	1.61	39
50-59 years	34,159	1.27	32
60-69 years	62,286	1.13	23
70-79 years	52,321	1.02	4
>80 years	16,443	0.92	-19

O/E : rapporto pazienti osservati/pazienti attesi; EAR: eccesso di rischio assoluto

Sulla base dell'analisi dei dati SEER, si è visto che anche nello sviluppo delle MPM il fumo e l'alcool sembrano avere un ruolo importante: ad essi, infatti, possono essere relazionati più di 11.000 dei 25.000 secondi cancri osservati in siti correlati a questa esposizione ,successivi ad una diagnosi di un cancro iniziale anch'esso tipicamente legato al fumo e all'alcool (es.: cavo orale, faringe, laringe, esofago, polmone) (Tab. 6).

Tab.6: Rischio di secondo tumore primario dopo qualsiasi primo tumore fortemente correlato con l' esposizione al fumo e/o all' alcool (SEER 1973- 2000)

SUBSEQUENT PRIMARY CANCER	TOTAL OBSERVED	O/E	EAR
All sites	24,688	1.82	105
Oral/pharynx	2,510	14.29	23
Larynx,lung/ bronchus	8,054	4.26	59
Esophagus	999	9.94	8
Bladder, renal pelvis, ureter	1,325	1.68	3
Kidney parenchyma	447	1.78	2
Pancreas	531	1.55	2
Cervix uteri	60	1.16	<1
Stomach	474	1.17	<1

O/E : rapporto pazienti osservati/pazienti attesi; EAR: eccesso di rischio assoluto

CORRELAZIONI EZIOPATOGENETICHE

2.1 Introduzione

Il numero di pazienti con diagnosi di MPM è in aumento e ci si aspetta un maggiore incremento negli anni a venire. Quest'osservazione potrebbe essere spiegata da diversi fattori, come l'incidenza stessa delle neoplasie primitiva, l'aumento della sopravvivenza della vita media, l'introduzione dei trattamenti adiuvanti che aumentano il tempo libero da malattia, l'accuratezza del follow-up nei pazienti neoplastici e la relativa prognosi favorevole di vari tumori.

La popolazione MPM è molto eterogenea. Per molti pazienti, le MPM sono attribuite a disordini ereditari [es. Poliposi Adenomatosa Familiare (FAP), sindrome ereditaria non poliposica del colon, tumori ovarici e mammari ereditari, neoplasie multiple endocrine], nei quali i meccanismi molecolari e le caratteristiche cliniche sono ben conosciute¹³⁻¹⁴.

2.2 Fattori di Rischio Ambientale

I dati attualmente disponibili sembrano supportare l'ipotesi che quasi il 90% di tutti i tumori maligni sia, in qualche modo, correlato allo stile di vita e/o a fattori ambientali (Tab.7) ¹⁵⁻¹⁶ .

Tab. 7:

PERCENTUALE DELLA MORTALITA' COMPLESSIVA DA TUMORI	
Tabacco	30%
Alcol	3%
Fattori dietetici	35%
Abitudini riproduttive- sessuali	7%
Occupazione	4%
Inquinamento	2%
Prodotti industriali	1%
Fattori iatrogeni	1%
Fattori geofisici	3%

Dati da *Cancer Control Objectives for the Nation: 1985-2000*, NCI Monograph n.2, 1986.

Diverse evidenze bibliografiche testimoniano come alcuni fattori, tra cui il fumo, l'alimentazione e le abitudini sessuali, possano svolgere un ruolo nell'insorgenza di tumori.

2.3 Fumo

Per quanto riguarda il fumo di sigaretta esistono diverse evidenze a favore della correlazione tra numero di sigarette fumate e rischio di cancro (Botteri). In una metanalisi dell'Istituto Europeo di Oncologia con risultati pubblicati nel 2008, su 26 studi osservazionali il rischio relativo per i soggetti fumatori è di 1,18 (intervallo di confidenza al 95%, 1,11-1,25) ¹⁷⁻¹⁹.

2.4 Dieta

L'associazione tra dieta di tipo occidentale (basso contenuto di fibre e alto tenore di grassi) e cancro del grosso intestino è stata confermata anche da una serie di studi caso-controllo (Gruppo di ricerca dell'Università delle Hawaii nel 1997) .

Si può ipotizzare che le fibre non digeribili, accelerando il transito intestinale, riducano il tempo di contatto della mucosa con la bile ed eventuali cancerogeni chimici introdotti per via alimentare. I grassi potrebbero agire attraverso la stimolazione della secrezione di bile la quale, in seguito all'azione della flora batterica intestinale, verrebbe in parte trasformata in composti cancerogeni ²⁰⁻²¹.

2.5 Genetica

L'eziopatogenesi delle MPM del colon retto e dell'apparato genitale maschile e femminile sembrerebbe essere strettamente correlata alla presenza di ben determinate alterazioni genetiche; analizzando la letteratura a nostra disposizione abbiamo riscontrato una coesistenza di alterazioni a carico dei microsatelliti, sia in cellule cancerose colon-rettali che in cellule appartenenti a neoplasie maligne dell'apparato genitale, ad esempio della mammella e dell'endometrio.

I microsatelliti sono corte sequenze di DNA ripetute, distribuite lungo tutta la catena del DNA. Mutazioni *germline* o inattivazione dei geni delle proteine di riparo di errori del mismatch (errori di accoppiamento delle basi durante la trascrizione) possono provocare un'espansione o una contrazione di queste frequenze.

L'instabilità dei microsatelliti è stata riscontrata in casi di HNPCC e adenocarcinomi coloretali sporadici ²².

La patologa Gologan A. ²³, che ha condotto uno studio per la valutazione dell'instabilità dei microsatelliti e del deficit del MMR del DNA nelle neoplasie gastrointestinali familiari e sporadiche, sostiene che i cancro principali, associati con il deficit di MMR del DNA, sono gli adenocarcinomi con cancro coloretale ereditario non

poliposico, anche noto come sindrome di Lynch. I carcinomi gastrointestinali sporadici, più comunemente carcinomi colonici e gastrici, possono, secondo l'Autrice, anche essere associati con deficit di MMR del DNA. Il deficit nel MMR cellulare porta ad una mutagenesi molto ampia, allo sviluppo neoplastico e alla progressione neoplastica.

Oltre che nel cancro colo-rettale, l'instabilità dei microsatelliti è stata riscontrata anche nel cancro sporadico e familiare della mammella, sebbene in differenti siti.

Il patologo cinese Fu Q. nel 2007 ha ricercato l'incidenza e il significato clinico- patologico dell'instabilità dei microsatelliti (M.S.I.) e della perdita di eterozigosità (LOH) sul cromosoma 3p nel carcinoma mammario ²⁴.

L'Autore, alla luce dei risultati del suo studio, afferma che l'inattivazione dei geni MMR è strettamente correlata con lo sviluppo del carcinoma mammario.

Affinché si possa affermare che entrambe le neoplasie possano avere un'origine genetica comune bisognerebbe eseguire studi approfonditi su pazienti che presentino una comorbilità per cancro colon-rettale e della sfera genitale, e in cui siano riscontrabili le alterazioni dei micro satelliti.

Sebbene non siano ancora disponibili risultati documentati in letteratura, crediamo che in futuro si potrà fare luce sul

significato di quest'associazione neoplastica

Uno studio molto interessante, che, rispetto a quelli succitati, può costituire un passo in avanti, è stato pubblicato nel 1998 su "Human Pathology" da Catasus L. et al.²⁵, relativo all'instabilità dei microsatelliti nel carcinoma endometriale, insorgente come unico cancro oppure in associazione col cancro del colon-retto nello stesso paziente.

Il gruppo di Catasus ha estratto il DNA di 42 pazienti con carcinoma dell'endometrio dal sangue e dal tessuto tumorale. L'instabilità dei microsatelliti a 3 o a più loci è stata individuata in 12 dei 42 casi (28%).

L'instabilità dei microsatelliti era più frequente nella variante endometriode (11/33, 33%) rispetto ai non endometrioidi (1/9). E' stato, pertanto, concluso che l'instabilità dei microsatelliti è una comune anomalia genetica del carcinoma endometriale.

L'Autore ha trovato inoltre che il microsatellite Bat26 ha un importante ruolo nella carcinogenesi coloretale .

Negli ultimi anni si è posta sempre più attenzione allo studio del gene PTEN (Phosphatase and tensin homologue), la cui scoperta è avvenuta nel 1997. Tale gene, localizzato sul braccio lungo del cromosoma 10 (10q23.31), è un oncosoppressore che codifica per una

fosfatasi con attività di antagonista diretto di PI3K ²⁶.

La perdita di funzione del gene PTEN, a causa di parziali mutazioni a mosaico, predispone a un gruppo di malattie definite “sindromi tumorali amartomatose associate a PTEN”. Tra queste, la più frequente è la Sindrome di Cowden (CS), caratterizzata da un’elevata suscettibilità a carcinoma della tiroide, della mammella, dell’endometrio, del cervello e a polipi amartomatosi del tratto gastrointestinale ^{27- 28}.

Questi dati gettano le basi per nuovi studi, volti alla maggiore comprensione del ruolo del gene PTEN nella tumorigenesi delle MPM.

2.6 Correlazione Endocrina

Data la maggiore incidenza delle neoplasie gastrointestinali, in particolare del colon- retto, nel sesso maschile, e tenuto conto del fatto che la differenza tra i due sessi è maggiore al di sotto dei 50 +/- 2 anni (età menopausale per le donne) si può ipotizzare che gli estrogeni siano un fattore protettivo per lo sviluppo di tale patologia. Tale ipotesi è rafforzata dall’osservazione clinica che donne in terapia ormonale sostitutiva presentano un’incidenza di neoplasia inferiore a donne in menopausa ²⁹.

Differenze sessuali, inoltre, esistono tra il tipo di cancro e

la localizzazione nel colon con una maggior incidenza di cancro del colon destro nelle donne rispetto agli uomini.

La regolazione ormonale comune dei tumori colo-rettali e di quelli della sfera genitale maschile e femminile trova conforto in diversi lavori nella letteratura internazionale. Gli estrogeni e i loro recettori giocano un ruolo importante nella regolazione della crescita delle cellule tumorali coloniche, interagendo con altre molecole richieste per la proliferazione cellulare come fattori di crescita e poliammide³⁰⁻³².

IL RUOLO DEI GENI NEI TUMORI

I tumori sono patologie che hanno origine in una cellula la cui crescita va fuori controllo moltiplicandosi a dismisura. In una cellula normale vi sono numerosi geni che controllano i meccanismi che vigilano sul processo di crescita cellulare garantendone il corretto funzionamento.

Tuttavia, questi meccanismi della cellula possono smettere di funzionare perché i relativi geni di riferimento hanno accumulato nel tempo una serie di errori chiamati "mutazioni". Le mutazioni possono avvenire sia per esposizione ad agenti cancerogeni (per esempio il fumo) sia per cause legate all'invecchiamento.

Accumulare mutazioni genetiche nel proprio DNA è infatti un fatto naturale che avviene gradualmente nel corso della vita di una persona. Perché una cellula diventi una cellula tumorale occorre che abbia accumulato numerose mutazioni e ciò è tanto più probabile che avvenga quanto più anziano è l'individuo.

L'esposizione ad agenti cancerogeni non fa che aumentare la velocità con cui avviene questo processo.

Tra le patologie che conferiscono una predisposizione familiare al CRC, AD ESEMPIO, la più comune è la poliposi adenomatosa familiare (FAP), che assieme ad altre poliposi ereditarie e alla carcinosi ereditaria del colon-retto su base non poliposica (HNPCC o sindrome di *Lynch*) è

responsabile di circa il 5% dei CRC ereditari ³³. La probabilità di trasmettere alla prole il gene alterato è del 50 per cento, indipendentemente dal sesso.

Condition	Clinical features	Genes responsible
Familial adenomatous polyposis (FAP)	Hundreds to thousands of adenomatous polyps in colon and rectum	APC
Hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC)	Family history of CRC and other cancers	<i>hMLH1, hMSH2, hMSH6, hMSH3, hPMS2</i>
Peutz Jegher's syndrome	Hamartomatous polyps in small bowel and peri-oral pigmentation	<i>LKB1, STK11</i>
Juvenile polyposis	Hamartomatous polyps in stomach and large bowel	<i>SMAD4, PTEN, BMPR1A</i>
Hereditary gastric cancer	Family history of gastric carcinoma and CRC	<i>CDH1</i>

Tabella 1. Sindromi cliniche con un aumentato rischio per il carcinoma del colon-retto e loro basi genetiche (da Fearnhead NS. et al, British Medical Bulletin 2002).

3.1 Alterazioni genetiche classiche associate al carcinoma colon rettale

La progressione tumorale dallo stato di adenoma a quello di carcinoma è accompagnata da alterazioni genetiche multiple ed è conosciuta come sequenza adenoma-carcinoma (Figura 1) ³⁴.

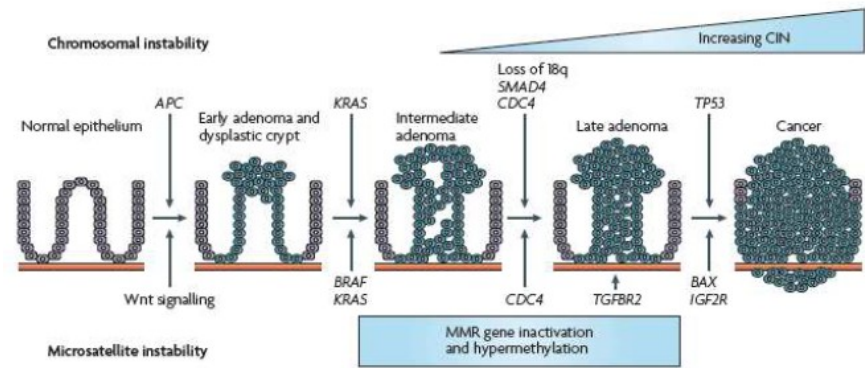


Figura 1: Descrizione della sequenza adenoma-carcinoma. L'ordine temporale in cui i geni chiave possono essere interessati è mostrata insieme allo stadio istologico del tumore (da Walther A. et al, Nat Rev Cancer 2009).

Il CRC prende origine, in oltre il 90% dei casi, da un precursore focale, displastico, polipoide: l'adenoma o polipo adenomatoso. Si tratta di piccole escrescenze, di per sé benigne, dovute al proliferare delle cellule della mucosa intestinale. Non tutti i polipi tendono a degenerare e la probabilità di trasformazione neoplastica aumenta nei cosiddetti “adenomi ad alto rischio” che presentano, cioè, caratteristiche microscopiche specifiche (componente villosa, displasia grave) e dimensioni superiori a un centimetro. Si stima che circa il 25% degli adenomi ad alto rischio si trasformi in tumore maligno attraverso una serie di passaggi intermedi legati a mutazioni di carattere genetico. L'evento più precoce nella tumorigenesi del CRC è legato alla formazione dei polipi adenomatosi in seguito alla mutazione inattivante o alla perdita del gene APC (*Adenomatous Polyposis Coli*), riscontrata in circa l'80% dei casi di CRC. Esso codifica per una proteina citoplasmatica che promuove la degradazione della beta-catenina, limitando in questo modo la trascrizione dei geni del ciclo cellulare controllati da Wnt ³⁵. Tale gene è un *tumor suppressor* ed è coinvolto in una varietà di processi cellulari oltre alla proliferazione cellulare, quali migrazione cellulare e adesione, è correlato al mantenimento della stabilità cromosomica, nonché dell'organizzazione del citoscheletro. L'aggravarsi degli adenomi e la progressione verso la forma di carcinoma è legata all'acquisizione di

mutazioni a livello del gene KRAS. La famiglia Ras è costituita da tre membri noti come HRAS, KRAS ed NRAS, localizzati su cromosomi differenti da proto-oncogeni e codificanti proteine G del peso di 21 KDa. La proteina KRAS è localizzata nella membrana cellulare ed è dotata di attività GTPasica ³⁶. Il legame extracellulare di specifici ligandi al recettore transmembrana come l'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) comporta l'attivazione di una cascata di eventi di trasduzione del segnale che mediano le risposte cellulari ai segnali di crescita. Il 50% dei casi di CRC sporadico presenta mutazioni puntiformi a carico del gene KRAS, il 70% delle quali si verifica a livello dei codoni 12 e 13 ³⁷. La mutazione attivante KRAS svolge un ruolo fondamentale nella progressione tumorale di CRC, in quanto sembrerebbe essere associata all'acquisizione di un comportamento più invasivo da parte delle cellule tumorali, ed è seguita da delezioni del cromosoma 18q con la perdita di SMAD4, localizzato a valle di TGFβ (*Transforming Growth Factor-β*), e da mutazioni del gene TP53 nel passaggio da adenoma avanzato a carcinoma. Il gene TP53 è spesso deletato nelle forme tumorali ad alto rischio, che hanno una minor probabilità di sopravvivenza, ma tuttavia non è del tutto considerato un marcatore prognostico come KRAS poiché non è stato possibile correlare la sua perdita all'*outcome* dei pazienti nel trattamento farmacologico ³⁸.

3.2 Altre alterazioni genetiche

Uno degli oncogeni a più alta frequenza di mutazione nei tumori solidi è il fattore di trascrizione MYC, che risulta amplificato e sovraespresso nel tumore al colon, alla prostata, al polmone e nel medulloblastoma ³⁹. I geni attivati da MYC sono coinvolti nel metabolismo cellulare, nella biosintesi delle proteine, nel ciclo cellulare e apoptosi e per molti microRNA, come il cluster miR-17- 92, sovraespresso in molti tumori e considerato ormai un oncomiR ⁴⁰, è stato ormai dimostrato il controllo diretto o indiretto da parte di MYC. Inoltre MYC è a sua volta controllato dalla *pathway* di Wnt/â-catenina, che ne promuovono l'espressione, e per questo motivo gioca un ruolo nella formazione delle cellule staminali tumorali o *cancer initiating cells* ⁴¹. Queste cellule rappresentano solo una piccola sottopopolazione, presentano specifici marcatori di superficie (CD133 nel tumore al colon) ed hanno un'estensiva capacità proliferativa *in vitro* e tumorigenica *in vivo* ⁴².

Coinvolto nel mantenimento di un fenotipo *stemness* e associato al tumore al colon, il gene *tumor-suppressor* PTEN, che codifica per una fosfatasi che trasforma il PIP3 (fosfatidil-inositolo 3-fosfato) in PIP2 (fosfatidil-inositolo 2- fosfato), determina il blocco del segnale di proliferazione cellulare innescato da questo secondo

messaggero. Questo gene risulta mutato o deletato in molte forme tumorali e la sua normale attività si esplica determinando il blocco dei segnali proliferazione e l'induzione all'apoptosi ⁴³. Nel tumore al colon in particolare la sua perdita è correlata a forme ereditarie rare associate alla *PTEN Hamartoma Tumor Syndrome* (PHTS)

⁴⁴ e alla resistenza farmacologica ⁴⁵⁻⁴⁶. Anche altri geni della *pathway* del fosfatidil-inositolo 3-fosfato sono stati trovati mutati in CRC. Ad esempio, il gene PIK3CA (*Phosphoinositide-3- Kinase, Catalytic, Alpha*) rappresenta uno dei geni a più alta frequenza di mutazione sia nel tumore al colon-retto che in quello al seno ⁴⁷, e sue mutazioni attivanti sono associate a resistenza farmacologica .

Recenti progressi nell'applicazione degli studi di associazione genomica o *Genome-Wide Association Study* (GWAS) hanno permesso l'identificazione di nuovi geni candidati fattori di rischio o di suscettibilità coinvolti nel CRC. Fino a metà del 2007 non era stato identificato nessun polimorfismo o varianti comuni che in maniera riproducibile potevano essere associati al rischio di insorgenza di CRC. Una maggiore rigosità nella selezione del fenotipo e l'avvento di metodiche di *screening* per polimorfismi tramite piattaforme *high-throughput* (HT) ha permesso negli ultimi anni di

identificare 10 varianti a bassa penetranza associate al CRC che potrebbero contribuire all'eziologia del tumore. Tra le dieci varianti di suscettibilità identificate vi sono SNP associati a geni della famiglia del TGF β , inclusi SMAD7, GREM1, BMP2, BMP4 e RHPN2. Questa elevata rappresentanza di geni della famiglia TGF β suggerisce un ruolo chiave di questa *pathway* nella predisposizione alle forme sporadiche del CRC ⁴⁸.

3.3 Il gene PTEN

PTEN (Phosphatase and tensin homolog) è uno dei principali geni oncosoppressori del nostro corpo

Scoperto nel 1997 come un gene soppressore del tumore localizzato sul cromosoma umano 10q23 è stato dimostrato di essere coinvolto nella regolazione di una varietà di fenotipi e la sua principale funzione di soppressione del tumore è raggiunto dalla down-regulation della oncogeno Akt / PKB (Protein Kinase - B). ⁴⁹

I geni oncosoppressori - o più precisamente le proteine da essi codificate - assolvono ad una grande varietà di funzioni, generalmente in contrasto con le funzionalità espresse dagli oncogeni. Se gli oncogeni infatti, nella maggioranza dei casi, presiedono a tutti i meccanismi di accrescimento e proliferazione cellulare, gli

oncosoppressori si pongono come limite a tali funzioni.

Più nel dettaglio, le funzioni degli oncosoppressori possono essere le seguenti.

- Repressione di geni essenziali per la prosecuzione del ciclo cellulare. Se tali geni non sono espressi, la cellula non sarà in grado di progredire verso la mitosi.
- Interruzione del ciclo cellulare in caso di DNA danneggiato. Finché in una cellula è presente DNA danneggiato non riparato, essa non è in grado di dividersi. Solo se il DNA viene riparato, la cellula può proseguire con il ciclo.
- Avvio dell'apoptosi. Se il danno non può essere riparato, nella cellula viene avviata l'apoptosi, un processo di morte cellulare programmata che rimuove il rischio che tale cellula possa nuocere all'organismo.
- Soppressione di metastasi.

Diverse proteine coinvolte nell'adesione cellulare sono in grado di impedire alle cellule tumorali di disseminarsi nell'organismo (un processo definito metastasi) e di ripristinare l'inibizione da contatto.

Il gene pTEN quindi fornisce le istruzioni necessarie per produrre una proteina che è presente in tutti i tessuti.

Quando lavora correttamente aiuta a controllare il ciclo di vita e di morte delle nostre cellule impedendo alle cellule di crescere e di moltiplicarsi troppo rapidamente ed in

modo incontrollato.

La proteina PTEN modifica altre proteine e grassi (lipidi) rimuovendone i gruppi fosfato e per questa sua attività la proteina PTEN fa parte di un gruppo di enzimi chiamato fosfatasi.

Agisce come parte di un sistema che manda un segnale di stop alla divisione cellulare e obbliga le cellule a sottostare ad una forma di morte programmata chiamata apoptosi

Quando non funziona a pieno ritmo, le cellule possono moltiplicarsi senza controllo per diventare formazioni tumorali, sia benigne che maligne.

Evidenze scientifiche suggeriscono anche che l'enzima PTEN contribuisca a controllare il movimento cellulare (migration), l'adesione delle cellule al tessuto circostante e la formazione di nuovi vasi sanguigni (angiogenesi).

Le patologie causate da mutazioni del gene PTEN sono state accomunate in un gruppo chiamato :

PTEN Hamartoma Tumor Syndrome (PHTS)

che comprende:

- " Sindrome di Cowden (che predispone a carcinoma di tiroide, mammella, cervello, endometrio e polipi amartomatosi del tratto gastro-intestinale)
- " Sindrome di Bannayan-Riley-Ruvalcaba
- " Sindrome macrocefalia-autismo

- " Malattia di Lhermitte-Duclos
- " Crescita segmentaria eccessiva - lipomatosi -
malformazione arterovenosa - nevo epidermico (sindrome
SOLAMEN)
- " Poliposi infantile e giovanile
- " Sindrome Proteus-simile - ritardo mentale - anomalie
dell'occhio
- " Sindrome del cancro ereditario della mammella e dell'ovaio

I TUMORI EREDITARI

La maggior parte delle mutazioni responsabili dell'insorgenza di tumori sono mutazioni somatiche, cioè avvengono nella stessa cellula somatica (fegato, pancreas, ecc.) che poi diventerà tumorale, non interessano le cellule della linea germinale e quindi non sono ereditarie. Tuttavia in un numero ristretto di casi, cosiddetti "ereditari", le mutazioni sono costitutive, dunque presenti in tutte le cellule dell'individuo. Possono essere perciò tramandate di generazione in generazione e la loro presenza può essere individuata nel DNA estratto da un normale prelievo di sangue. In questo caso, l'individuo nasce con un patrimonio genetico già alterato che rende più elevata la probabilità di sviluppare specifici tumori nel corso della propria esistenza.⁵⁰

I geni sono ereditati da entrambi i genitori. Pertanto, se uno dei due genitori ha una mutazione genetica ereditaria, i figli hanno il 50% di probabilità di ereditarla. Più distante è il parente con la mutazione genetica, minore è la probabilità di ereditarla. Possedere queste mutazioni ereditarie nel proprio patrimonio genetico non dà di per sé la certezza di sviluppare il cancro. Tuttavia, questi individui sono molto più a rischio degli altri perché il DNA delle proprie cellule è già alterato e sarà sufficiente un numero inferiore di mutazioni per sviluppare tumori⁵¹.

Il legame che esiste fra alcune specifiche mutazioni

genetiche e alcune tipologie di cancro è un'area in cui si stanno concentrando sempre di più gli sforzi dei ricercatori. L'eventuale presenza della mutazione nel patrimonio genetico del paziente fa aumentare in modo significativo la probabilità di sviluppare alcune tipologie di tumore. Identificare tempestivamente l'esistenza di queste mutazioni è un passo molto importante per la prevenzione e la diagnosi precoce di questi tipi di tumore ed eventualmente per il trattamento del paziente stesso. Di seguito i tumori per i quali è possibile eseguire il test genetico

- **Tumori ereditari della mammella e dell'ovaio** :

Il 5-10% dei tumori della mammella e dell'ovaio insorge in individui geneticamente predisposti. La predisposizione viene trasmessa come carattere autosomico dominante.

Le forme tumorali ereditarie hanno specifiche caratteristiche: 1) elevato numero di persone affette nello stesso ramo della famiglia (materno o paterno); 2) esordio precoce; 3) elevata frequenza di lesioni bilaterali; 4) associazione con il tumore ovarico (a tutte le età); 5) presenza di tumore della mammella nei maschi. I test genetici consentono di definire la diagnosi molecolare e di stabilire linee guida per migliorare la presa in carico delle persone ad elevato rischio.

Geni coinvolti: BRCA1 - BRCA2

- **Sindrome di Lynch**

La sindrome di Lynch, nota anche come Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (HNPCC), è una sindrome di predisposizione genetica che aumenta il rischio di sviluppare un cancro del colon-retto nel corso della vita. Oltre a questo tumore, le persone affette sono geneticamente predisposte a sviluppare anche tumori ad altri organi, come endometrio, intestino tenue, tessuto uroteliale (pelvi renale e uretere), stomaco, ovaio, pancreas e vie biliari, cervello, ghiandole sebacee.

Geni coinvolti: MLH1 - MSH2 - MSH6

- **Poliposi Adenomatosa Familiare (FAP)**

Malattia rara a trasmissione genetica dominante caratterizzata dalla comparsa, di solito in età giovanile, di centinaia o migliaia di adenomi distribuiti nei vari segmenti dell'intestino. Se i polipi sono meno di 100 (da 10-20 a 99) si parla di Poliposi Familiare Attenuata (AFAP). Se non trattata, la FAP progredisce quasi invariabilmente verso lo sviluppo di uno o più carcinomi coloretali, di solito nella terza o quarta decade di vita; la comparsa di lesioni maligne può essere prevenuta attraverso un'attenta sorveglianza endoscopica ed un tempestivo intervento chirurgico.

Geni coinvolti: APC-MUTYH

- **Sindrome di Li-Fraumeni**

Malattia rara a trasmissione genetica dominante che predispone giovani individui a diverse patologie tumorali quali, in particolare, gli osteosarcomi, i sarcomi dei tessuti molli, i tumori della mammella, leucemie, linfomi, tumori cerebrali e della corteccia surrenale.

Gene coinvolto: TP53

- **Sindrome di Cowden**

Malattia a trasmissione genetica dominante che si caratterizza per la presenza di malformazioni multiple a livello della mammella, della cute, della tiroide, del tubo digerente, dell'endometrio e del cervello con conseguente elevato rischio di sviluppare forme tumorali invasive.

Gene coinvolto: PTEN

- **Tumori ereditari gastrici "diffusi"**

Rara sindrome autosomica dominante, nota come Hereditary Diffuse Gastric Cancer (HDGC), caratterizzata dall'insorgenza di tumori gastrici diffusi e di tumori della mammella di tipo lobulare. L'età di esordio è inferiore rispetto a quella osservata nel carcinoma gastrico classico. La sindrome è caratterizzata dalla proliferazione ghiandolare maligna di cellule ad "anello con castone" nello stroma fibroso. A differenza degli altri carcinomi gastrici il tipo diffuso invade spesso il peritoneo e il

sistema linfatico.

Geni coinvolti: CDH1

Sindrome di Peutz-Jeghers

Malattia rara a trasmissione genetica dominante che coinvolge l'intero tubo digerente. È caratterizzata dalla comparsa di polipi e da pigmentazioni cutanee, specie in prossimità delle mucose della bocca, della regione anale e delle dita. I soggetti affetti da questa malattia corrono anche un rischio maggiore di sviluppare altre forme cancerose come il tumore dell'ovaio, del testicolo, del collo dell'utero e del pancreas.

Gene coinvolto: STK11

TARGETS MOLECOLARI E TRATTAMENTO DEL CARCINOMA COLO-RETTALE

Il tipo di trattamento del CRC dipende da una pluralità di fattori e principalmente dalle dimensioni, dalla localizzazione e dall'estensione del tumore, nonché dalle condizioni generali del paziente. Sono applicabili vari tipi di trattamento, dall'intervento chirurgico, alla radioterapia, immunoterapia o chemioterapia. Quest'ultima, che consiste nell'utilizzo di farmaci antitumorali per distruggere le cellule cancerose, viene impiegata oltre che per controllare la crescita neoplastica o alleviare i sintomi della malattia, anche dopo trattamento chirurgico ai fini di eliminare le cellule tumorali residue. Talvolta diventa necessario utilizzare combinazioni di trattamenti diversi. Attualmente, sono disponibili differenti regimi di agenti chemioterapici dotati di effetto citotossico, quali le fluoropirimidine (inibitori della timidilato sintasi), l'oxaliplatino (un analogo del platino che viene spesso associato alla terapia con fluoropirimidine), o l'irinotecan (un inibitore della topoisomerasi I). Tuttavia, le nuove linee di ricerca farmacologica si sono rivolte all'identificazione di agenti in grado di interferire in maniera selettiva contro bersagli molecolari specifici al fine di aumentare la selettività del bersaglio e di ridurre gli effetti collaterali sistemici. Questi

nuovi farmaci vengono usati sia da soli che in associazione ad agenti chemioterapici classici in *trials* chemioterapici. Tra i nuovi farmaci più utilizzati nel trattamento del CRC si annoverano gli inibitori dell'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) e gli inibitori delle tirosin-chinasi a basso peso molecolare, oppure gli inibitori del VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) come il bevacizumab.

TERAPIA ANTI-EGFR: CETUXIMAB E PANITUMUMAB

L'egfr è un membro della famiglia di recettori erbb, costituita da quattro recettori correlati tra loro, erbb1, erbb2, erbb3 ed erbb4, che nella loro forma attiva formano omodimeri od eterodimeri i quali vengono stabilizzati dal legame del loro ligando ⁵². L'egfr rappresenta il collegamento tra lo spazio extracellulare ed il sistema intracellulare di trasduzione del segnale che regola i processi nucleari coinvolti nella crescita cellulare, differenziamento, sopravvivenza, progressione attraverso il ciclo cellulare, angiogenesi e sensibilità ai farmaci ⁵³. Sono stati identificati diversi ligandi per l' egfr, tra cui egf, tgfa e la neoregulina; il loro legame nella porzione extracellulare del recettore ne determina l' attivazione tramite autofosforilazione del dominio tirosin-chinasico,

che a sua volta è responsabile dell'attivazione della cascata di segnali intracellulari. Sono state individuate diverse *pathways* controllate da questi recettori, tra cui quelle di jak-stat, pik3-akt e la cascata ras- raf-mapks. Quest'ultima è innescata dall'attivazione di ras e a successive serie di fosforilazioni in grado di attivare le mapks, erk1 ed erk2. Erk1/2 regolano la trascrizione di molecole associate alla proliferazione, sopravvivenza e trasformazione (figura 2)

54

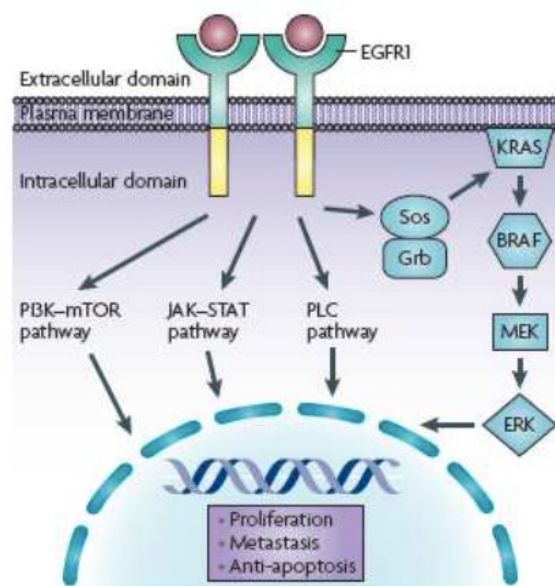


Figura 2. EGFR e *pathways* molecolari da esso regolate (da Walther A. et al, Nat Rev Cancer 2009).

L'EGFR è frequentemente sovraespresso o iperattivato nei tumori di origine epiteliale, incluso il CRC, e tale sovraespressione è stata spesso associata alla resistenza dei tumori ai farmaci dotati di attività citotossica, tanto da rappresentare un indicatore di prognosi sfavorevole⁵⁵.

L'approccio terapeutico più recente è rappresentato da anticorpi monoclonali rivolti contro l'EGFR, in grado di inibire l'interazione tra l'EGFR ed i suoi ligandi naturali nello spazio extracellulare. Il recettore viene internalizzato e degradato portando al blocco del ciclo cellulare, all'inibizione dell'angiogenesi, invasione e metastatizzazione; inoltre l'azione antitumorale viene condotta attraverso fenomeni di citotossicità cellulare mediata da anticorpi. Dal 2004 ad oggi sono state sviluppate diverse terapie basate su anticorpi monoclonali contro l'EGRF. Tra le prime molecole utilizzate sui pazienti ci sono stati il Cetuximab (Erbix) e il Panitumumab (Vectibix) (Figura 3).

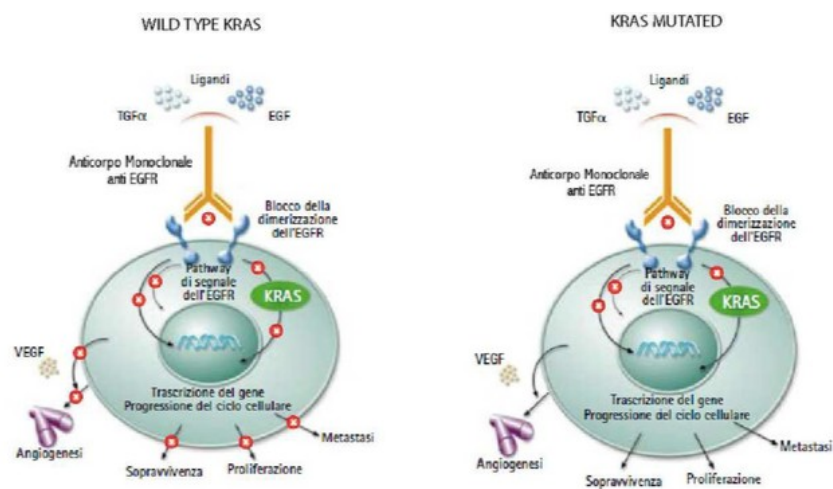


Figura 3. Terapia anti-EGFR e mutazioni di KRAS.

Il Cetuximab è un anticorpo monoclonale IgG1 chimerico uomo/topo e ad ampia azione, che agisce contro il dominio extracellulare dell'EGFR⁵⁶. Come anticorpo monoclonale,

la modalità di azione del Cetuximab si distingue dai trattamenti chemioterapici standard non selettivi: il legame comporta l'internalizzazione del recettore causando una diretta inibizione della sua attività tirosin-chinasica. Ciò a sua volta provoca il blocco della trasduzione del segnale attraverso le vie PI3K/AKT e RAS-RAF/MAPKs, inducendo meccanismi proapoptotici ed inibendo la proliferazione cellulare, l'angiogenesi e la formazione di metastasi (Fig.3). Ciò comporta la riduzione sia dell'invasione dei tessuti normali da parte delle cellule tumorali sia dell'espansione del tumore a nuovi siti. Si ritiene, inoltre, che il Cetuximab sia in grado di inibire l'attività riparatoria delle cellule tumorali verso il danno causato dalla chemioterapia e radioterapia, e di impedire la formazione di nuovi vasi sanguigni all'interno dei tumori; ciò si traduce in una globale soppressione della crescita tumorale.

L'effetto collaterale più comune associato alla somministrazione del Cetuximab è uno sfogo epidermico simile all'acne che sembra comunque essere correlato ad una buona risposta alla terapia ⁵⁷. L'efficacia anti-tumorale del Cetuximab è stata dimostrata sia da solo che in combinazione con altri agenti chemioterapici: ad esempio, in pazienti metastatici con tumore al colon viene usato in associazione con l'irinotecan.

Il Panitumumab è un anticorpo monoclonale della classe IgG2, ed è il primo anticorpo monoclonale totalmente umano utilizzato in ambito terapeutico; come il Cetuximab, esso agisce inibendo l'attività dell'EGFR, bloccando il legame con l'EGF e il TGF- α ⁵⁸. Fin dal 2006 è stato approvato il suo utilizzo e ha mostrato una notevole efficacia antitumorale nei pazienti sia da solo che in combinazione con le fluoropirimidine, oxaliplatino e irinotecan.

E' noto che non tutti i pazienti affetti da CRC rispondono in modo positivo alla terapia con il Cetuximab o il Panitumumab: vi sono infatti dei fattori genetici predittivi della risposta, tra i quali sicuramente il più significativo è lo stato mutazionale di KRAS

Numerosi *trials* condotti negli ultimi anni hanno dimostrato che i pazienti CRC che presentano specifiche mutazioni puntiformi del gene KRAS a livello dei codoni 12 e 13 non rispondono alla terapia, mentre tutti i pazienti che rispondono positivamente al farmaco sono privi della mutazione ⁵⁹⁻⁶⁰. Oltre a KRAS, altri fattori coinvolti nell'efficacia della risposta alla terapia anti- EGFR sono il numero di copie di EGFR e la sua espressione, lo stato mutazionale di BRAF, PIK3CA e PTEN, ma la loro efficacia predittiva nella risposta alla terapia è tutt'ora da provare.

“CHIRURGIA DNA GUIDATA” esperienze nella FAP

La FAP è una sindrome relativamente rara a trasmissione autosomica dominante. Rappresenta una condizione precancerosa dovuta alla mutazione del gene APC.

Tradizionalmente nelle famiglie affette da **FAP** ci si basava su un'accurata anamnesi familiare seguita dall'esame endoscopico, ripetuto ogni 1-2 anni a partire dai 10-12 anni d'età.

Con l'identificazione della delezione del cromosoma 5⁶¹ e, in seguito, del gene APC, la genetica ha compiuto incredibili progressi e l'uso dei "DNA testing" abbinati allo screening clinico (endoscopia, esame del fondo oculare) hanno consentito una diagnosi con una specificità del 95% dei pazienti con un'accuratezza predittiva del 98%⁶².

Per la FAP lo schema attuale di screening prevede un prelievo di sangue venoso periferico per l'analisi molecolare e l'esame del fondo oculare, già attuabili in epoca neonatale o pediatrica. Nei soggetti positivi l'esame endoscopico di conferma è previsto a 15 anni e ripetuto annualmente fino allo sviluppo dei polipi, continuando l'esame fino a 45 anni nei casi di famiglie con esordio tardivo. Per i soggetti in cui non si trova la mutazione del gene va eseguita una coloscopia a 18, 25 e 35 anni, per non trascurare le possibilità di falsi negativi (regioni del gene

non analizzate, limiti delle tecniche o errori tecnici di laboratorio) a mosaicismi o mutazioni “de novo”.

Nei soggetti affetti da poliposi multiple, in particolare con degenerazione maligna o tumori sincroni associati con FAP classica o attenuate, con negatività al test per il gene APC andrebbero investigate eventuali mutazioni del gene MYH⁶³. I soggetti risultati sicuramente non portatori dell'anomalia genetica all'esame molecolare sono risparmiati dallo screening endoscopico.

L'approccio terapeutico nella **FAP** è particolarmente complesso ed impegnativo, perché comprende la profilassi ed il trattamento dell'adenomatosi, del cancro colico e delle ECM potenzialmente letali.

L'IPAA offre le maggiori garanzie oncologiche, ma maggior rischio di complicanze e peggiori risultati funzionali, dovendo ricorrere ad un'ileostomia definitiva in caso di insuccesso tecnico. D'altro canto l'IRA espone, com'è universalmente noto, al rischio di cancro del moncone rettale. Già negli anni '80 sono apparsi i primi studi che ne mettevano in risalto l'incremento esponenziale negli anni successivi alla colectomia profilattica, anche per pazienti puntuali a controlli endoscopici, come nell'esperienza del St Mark's con segnalazioni di insorgenza di ca anche a meno di sei mesi dall'ultima rettoscopia negativa⁶⁴.

L'analisi mutazionale può avere un ruolo di primo piano per stabilire l'età in cui sottoporre il paziente al trattamento chirurgico profilattico. La colectomia va, infatti, anticipata nelle famiglie “early onset” e procrastinata in quelle “late onset” o che presentino un rischio significativamente alto di sviluppare ECM come i desmoidi. Per mutazioni nei primi 4 esoni (AFAP) o nella regione dell'esone 15 associata ad un rischio elevato di desmoidi, è giustificato un atteggiamento più attendistico, rimandando l'intervento oltre i 20 anni.

La correlazione genotipo/fenotipo può essere determinante nella scelta tra IRA o IPAA, affiancandosi agli altri criteri clinici di scelta. Alcune delezioni (dopo il codone 1250), predisponendo maggiormente allo sviluppo del cancro, controindicherebbero un'IRA. Vasen ⁶⁵ ha evidenziato, infatti, come nel corso di follow-up dopo IRA in 87 pazienti la necessità di un secondo intervento sia stata significativamente più alta nei pazienti con mutazione ai codoni > 1250 ed anche Church ⁶⁶ ha segnalato come la maggior parte di pazienti sottoposti a proctectomia fossero portatori di mutazioni tra i codoni 1309 e 1328.

Anche se attualmente la chirurgia è il trattamento più efficace nei tumori eredofamiliari, negli ultimi anni alcuni studi hanno posto all'attenzione generale un possibile ruolo della chemioprevenzione (supplementi orali di Ca⁺, vit. C, FANS, inibitori della ciclossigenasi 2 – Cox2) ⁶⁷, Waddel ⁶⁸,

per primo, oltre 20 anni fa segnalò l'azione del sulindac, in grado di ridurre il numero e le dimensioni degli adenomi colici nella FAP ed un'importante conferma si ebbe nello studio prospettico di Giardiello. In alcuni trial randomizzati sono riportati risultati interessanti con sulindac e Celecoxib, così che la FDA negli Usa nel 2001 ha approvato il ricorso al Cox2 in caso di FAP in aggiunta alla sorveglianza endoscopica, mentre recentemente lo stesso Giardiello ⁶⁹ ha svalutato l'efficacia del sulindac.

Nei pazienti con AFAP con pochi adenomi può essere utile la polipectomia endoscopica seguita dalla somministrazione di Cox2 e successiva sorveglianza endoscopica.

Anche per le forme causate da mutazioni nel gene MYH, sebbene ad insorgenza più tardiva il solo screening con polipectomia non è sufficiente per prevenire il cancro. La chirurgia profilattica è indispensabile.

BIBLIOGRAFIA

1. Renda A et al - Multiple Primary Malignancies - Springer-Verlag Italia 2009
2. Kan JY et al - Clinical characteristics of patients with sporadic colorectal cancer and primary cancers of other organs - Kaoscing J Med Sci 2006 Nov; 22(11): 547-553
3. Dodaro C et al - Colonic carcinoma associate to primary extracolonic malignant tumors - Dig Surgery 1997; 10:105-106
4. Dodaro C et al - "Sporadic" colorectal tumors in Multiple Primary Malignancies - Springer Italia 2009; Chapter 12, pagg.179-194
5. Crocetti E et al- Problems related to coding of multiple primary cancer - Eur J Cancer 32A:1366-1370
6. Moertel C et al - Multiple primary malignant neoplasms - Cancer 1977 ; 40:1786-1792
7. Warren S, Gates O – Multiple primary malignant tumors: a survey of the literature and statistical study – Am J Cancer. 1932; 16:1358-414
8. Montella M et al - Epidemiology: Data from Cancer Registries – Springer-Verlag Italia 2009; Chapter 2
9. Cangemi V et al -I tumori maligni multipli primitivi- Chirurgia 1990; 3:461-466
10. Levi F et al - Multiple primary cancers in the Vaud Cancer Registry, Switherland, 1974-89 - J. Cancer 1993; 67(2): 391-5
11. Levi F et al - Second neoplasms after invasive and borderline ovarian cancer - Eur. J. Cancer Prev. 2009; 18(3): 216-9
12. Bathia S - What is the risk of second malignant neoplasms after childhood cancer? – Nat Clin Pract Oncol 2(4):182-183
13. Carlomagno N et al, Renda A editor – The hereditary syndromes. Multiple Primary Malignancies.- 2009:1-6. Doi: 10.1007/978-88-470- 1095-6_1 (Update in Surgery, Springer) [Cross Ref].
14. Carlomagno N et al – Familial colonic polyposis: effect of molecular analysis on the diagnostic-therapeutic approach- Ann Ital Chir. 2001; 72(2):207-14 [PubMed].
15. Le Marchand - Associations of sedentary lifestyle, obesity,smoking, alcohol use, and diabetes with the risk of colorectal cancer- Cancer 1997;57(21): 4787-94
16. Boffetta P, Hashibe M, La Vecchia C et al – The burden of cancer attributable to alcohol

drinking – (2006) *Int J Cancer* 119(4):884-887

17. Botteri E. et al - Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis – *JAMA* 2008; 300(23): 2765-78

18. Croghan I. et al - The role of smoking in breast cancer development: an analysis of a Mayo Clinic cohort – *Breast J.* 2009; 15(5): 489-95

19. Vineis P, Alavanja M, Buffler P et al – Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence- (2004) *J Natl Cancer Inst* 96(2):99-106

20. Nomura AM. et al - Dietary fiber and colorectal cancer risk: the multiethnic cohort study - *Cancer Causes Control.* 2007; 18(7): 753-64

21. Willet WC – Diet and cancer: one view at the start of the millennium- *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 2001; 10(1):3-8 [PubMed].

22. Muta M. et al - Clinical implications of microsatellite instability in colorectal cancers - *Cancer* 1996; 77(2): 265-70

23. Gologan A. et al - Microsatellite instability and DNA mismatch repair testing in hereditary and sporadic gastrointestinal cancers – *Clin. Lab. Med.* 2005; 25(1): 176-96

24. Fu Q. et al - Microsatellite instability and allele-specific chromosome 3p deletion in breast cancer and precancerous lesions – *Zhonghua Zhong Liu* 2007; 29(1): 34-40

25. Catasus L. et al - Microsatellite instability in endometrial carcinomas: clinicopathologic correlations in a series of 42 cases - *Human Pathology* 1998; 29(10):1160-4

26. Cezary Cybulski et al – Multiple primary cancers as a guide to heritability - *Int J Cancer* 2014;135,1756-1763

27. Salo-Mullen E, Shia J et al – Mosaic partial deletion of the PTEN gene in a patient with Cowden syndrome- *Familial Cancer* 2014; 13:459- 467 doi 10.1007/s10689-014-9709-4

28. Nieuwenhuis MH et al – Cancer risk and genotype-phenotype correlations in PTEN hamartoma tumor syndrome- *Fam Cancer* 2014; 13(1):57-63. doi:10.1007/s10689-013-9674-3

29. Chlebowski RT. – Estrogen plus progestin and colorectal cancer in postmenopausal women –*New England Journal of Medicine* 2004; 350:991-1004

30. Grodstein F. et al - Postmenopausal hormone use risk for colorectal cancer adenoma- *Annals of Internal Medicine* 1998; 128: 705-12

31. Rossouw JE. et al - Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's

Health Initiative randomized controlled trial –AMA 17/2002; 288(3): 321-333

32. Hazel B. et al - Oral contraceptive use, reproductive factors, and colorectal cancer risk: findings from Wisconsin – Cancer Epidemiol. Biomarkers 2005; 14(5): 1212-8

33. Orloff MS, Eng C. Genetic and phenotypic heterogeneity in the PTEN hamartoma tumour syndrome. *Oncogene*. 2008, 27:5387-97.

34. Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, Kerr D. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2009;9:489-99.

35. Reya T, Ceviers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 2005, 434:843-50.

36. Peyssonnaud, C. and Eychene, A. The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biol. Cell* 2001, 93: 53–62.

37. Heinemann V, Stintzing S, Kirchner T, Boeck S and Jung A. Clinical relevance of EGFR- and KRAS-status in colorectal cancer patients treated with monoclonal antibodies directed against the EGFR. *Cancer Treat Rev* 2009, 35:262–271.

38. Munro AJ, Lain S, Lane DP. P53 abnormalities and outcomes in colorectal cancer: a system review. *Br J Cancer* 2005, 92:434-44.

39. Santarius T, Shipley J, Brewer D, Stratton MR, Cooper CS. A census of amplified and overexpressed human cancer genes. *Nat Rev Cancer* 2010, 10:59-64

40. He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, Powers S, Cordon-Cardo C, Lowe SW, Hannon GJ et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 2005, 435:828-33.

41. Reya T, Ceviers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 2006, 434:843-50.

42. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of human colon- cancer-initiating cells. *Nature* 2007, 445:111-5.

43. Salmena L, Carracedo A, Pandolfi PP. Tenets of PTEN tumor suppression. *Cell* 2008, 133:403-14.

44. Orloff MS, Eng C. Genetic and phenotypic heterogeneity in the PTEN hamartoma tumour syndrome. *Oncogene*. 2008, 27:5387-97.

45. Jhawer M, Goel S et al. PIK3CA mutation/PTEN expression status predicts response of colon cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab. *Cancer Res*. 2008;68:1953-61

46. Bardelli A, Siena S. Molecular mechanisms of resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28:1254-61.
47. Wood LD, Parsons DW, Jones S, Lin J, Sjöblom T, Leary RJ, Shen D, Boca SM, Barber T, Ptak J, et al. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science*. 2007, 318:1108-13.
48. Tenesa A, Dunlop MG. New insights into the aetiology of colorectal cancer from genome-wide association studies. *Nat Rev Genet*. 2009, 10:353-8.
49. Salmena L, Carracedo A, Pandolfi PP. Tenets of PTEN tumor suppression. *Cell* 2008,133:403-14.
50. Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009, 59:225-49.
51. AJCC Cancer Staging Manual (Sixth ed.).Springer-Verlag New York, Inc 2002
52. Matar P, Rojo F et al. Combined Epidermal Growth Factor Receptor Targeting with the Tyrosine Kinase Inhibitor Gefitinib (ZD1839) and the Monoclonal Antibody Cetuximab (IMC-C225): Superiority Over Single-Agent Receptor Targeting. *Clinical Cancer Res* 2004, 10:6487–6501.
53. Chan TL, Zhao W, Leung SY, Yuen ST; Cancer Genome Project. BRAF and KRAS mutations in colorectal hyperplastic polyps and serrated adenomas. *Cancer Res*. 2003 63:4878-81
54. Garassino MC, Borgonovo K et al. Biological and clinical features in predicting efficacy of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors: a systematic review and meta-analysis. *Anticancer Res*. 2009, 29:2691-701.
55. Ponz-Sarvisé M, Rodríguez J, Viudez A, Chopitea A, Calvo A, García-Foncillas J, Gil-Bazo I. Epidermal growth factor receptor inhibitors in colorectal cancer treatment: what's new? *World J Gastroenterol*. 2007, 13:5877-87
56. Heinemann V, Stintzing S, Kirchner T, Boeck S and Jung A. Clinical relevance of EGFR- and KRAS-status in colorectal cancer patients treated with monoclonal antibodies directed against the EGFR. *Cancer Treat Rev* 2009, 35:262–271.
57. Zhang O, Chen G, Liu X, Qian Q. Monoclonal antibodies as therapeutic agents in oncology and antibody gene therapy. *Cell Research* 2007 17: 89-99.
58. Strimpakos AS, Syrigos KN and Saif MW. Pharmacogenetics and biomarkers in colorectal Cancer. *The Pharmacogenomics Journal* 2009, 9:147–160.

59. Lievre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, Ychou M, Bouché O, Landi B, Louvet C et al. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2008;26:374–9
60. Benvenuti S, Sartore-Bianchi A et al. Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer Res* 2007;67:2643–8.
61. Bodmer WF, Bailey CJ, Bodmer J, et al: Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature* 1987; 328:614-16
62. A. Borrelli, N. Carlomagno, C. Dodaro, et al., “Ereditary Colorectal Cancer and Molecular Analysis”, *Tehniques in Coloproctology*, Vol. 7 – Supp.2, 2003.
63. Leite J. S., Isidro G., Martins M., et al. Is prophylactic colectomy indicated in patients with MYH-associated polyposis? *Colorectal Disease* 2005, 7, 327–331
64. Nugent KP, Philips RKS. Rectal cancer risk in older patients with familial adenomatous polyposis and an ileorectal anastomosis: a cause for concern. *Br J Surg* 1992; 79: 1204–06.
65. Vasen HF, van der Luijt RB, Slors JF, et al: Molecular genetic tests as a guide to surgical management of familial adenomatous polyposis. *Lancet* 1996;348(9025): 433-435
66. Church JM.: The ileal pouch-anal anastomosis in challenging patients: stretching the limits. *Aust N Z J Surg.* 1995;65(2):104-6
67. Huls G, Koornstra JJ, Kleibeuker JH.: Non-steroidal anti-inflammatory drugs and molecular carcinogenesis of colorectal carcinomas. *Lancet.* 2003 Jul 19;362(9379):230-2N *Engl J Med.* 2003 Mar 6;348(10):891-9
68. Waddell WR, Loughry RW.: Sulindac for polyposis of the colon. *J Surg Oncol.* 1983
69. Giardiello FM, Yang VW, Hyland LM, et al.: Primary chemoprevention of familial adenomatous polyposis with sulindac. *N Engl J Med* 2002, 346:1054- 1059

PARTE SPERIMENTALE

1. Introduzione

I Tumori Multipli Primitivi (MPM) sono tumori maligni insorti in un singolo paziente.

E' dimostrato come la perdita di funzione di PTEN predisponga a un gruppo di malattie definite "sindromi tumorali amartomatose associate a PTEN". Pertanto approfondimenti sul ruolo di PTEN rappresentano un avanzamento importante per determinare e monitorare il trattamento dei tumori ad esso associati.

L'incidenza dei tumori multipli primitivi, in letteratura è stimata intorno al 3% ¹.

Sempre più spesso siamo portati ad osservare pazienti che guariscono da un tumore maligno e che a 5 o più anni dal trattamento possono sviluppare ulteriori neoplasie per motivi apparentemente casuali o per fattori definiti:

- Genetici
- Ambientali
- Ormonali
- Immunologici
- Iatrogenici
- Virali.

Incoraggiati dalle evidenze scientifiche nel nostro Dipartimento, in collaborazione con il Dipartimento di Medicina Molecolare Biotecnologie Mediche del Policlinico Universitario Federico II, è stato avviato uno studio retrospettivo su una coorte di 167 pazienti di cui 72 trattati per MPM dal 2007 al 2017 e 95 pazienti che nonostante ipo-espressione di PTEN non hanno sviluppato un secondo tumore.

Tale studio, che ci proponiamo diventi anche prospettico , indaga sul significato e sulle prospettive terapeutiche della localizzazione del gene PTEN nella Oncogenesi nelle MPM (Multiple Primary Malignances) attraverso l'associazione tra uno studio citogenetico ed il normale trattamento chirurgico volto all'individuazione di un fenotipo MPM che coinvolga perdita di funzione di PTEN .

2. Correlazione Genetica

In alcuni casi si tratta di sindromi ereditarie codificate, la cui alterazione genetica è pressochè determinate.

Esistono altre associazioni di neoplasie maligne che non rientrano in quelle conosciute, non sono state ordinate dal punto di vista nosografico e che vengono comunemente definite “Sindromi non codificate”.

Per una corretta classificazione delle MPM si devono considerare diversi parametri:

- Temporali
- Istologici
- Anatomo-topografici
- Anatomo-funzionali

Problemi classificativi possono facilmente insorgere alla diagnosi della seconda neoplasia (sincrona o metacrona) che spesso avviene a notevole distanza di tempo.

Dal punto di vista clinico, gli MPM costituiscono una delle manifestazioni più frequenti delle sindromi familiari ereditarie.

La presenza di MPM, l'esordio precoce e la presenza di una storia familiare rappresentano i criteri principali per sospettare un disturbo ereditario.

MPM in diversi organi si trovano nella sindrome di Lynch, nella sindrome di Li-Fraumeni, nella sindrome seno-ovarica,² nella sindrome del melanoma familiare, e nella sindrome da neoplasia endocrina.³

L'aumento della suscettibilità individuale o familiare allo sviluppo di tumori multipli è spesso dovuta a mutazioni genetiche specifiche che determinano l'instabilità microsatellite o instabilità cromosomica, ereditata in maniera autosomica o si presentano come una nuova mutazione.⁴ Inoltre alcuni geni e i rispettivi percorsi biomolecolari sono ubiquitariamente coinvolti nello sviluppo del cancro di molteplici organi, anche con una diversa origine embrionale.

Pertanto nell'ambito degli MPM un approfondimento delle sindromi ereditarie già codificate, ovvero aventi un comune meccanismo eziopatogenetico, è indispensabile in quanto grazie alle attuali conoscenze biomolecolari sarà possibile nell'immediato futuro delineare quadri sovrapponibili a queste sindromi codificate anche all'interno di quel gruppo di MPM considerati sporadici.

E' particolarmente interessante poter approfondire le conoscenze dei meccanismi eziopatogenetici alla base di queste patologie e seguirne la conseguente evoluzione, potendo così osservare lo sviluppo della malattia dall'alterazione del DNA o di un oncogene/oncosoppressore fino alla manifestazione clinica più eclatante, cui siamo chiamati ad intervenire.

Ne deriva un modello di sviluppo multistage che coinvolge:

- autosufficienza dai segnali di crescita
- insensibilità agli inibitori dei fattori di crescita
- assenza di apoptosi
- neo-angiogenesi
- meno limiti al potenziale replicativo
- alterazioni delle difese immunitarie
- metastasi

ed i cui attori fondamentali sono oncogeni, oncosoppressori e geni riparatori del DNA che cooperano influenzandosi vicendevolmente in un processo a cascata i cui prodotti fondamentali sono:

- fattori di crescita
- recettori per i fattori di crescita
- trasduttori del segnale
- fattori di trascrizione
- modellatori della cromatina
- regolatori dell'apoptosi.

Inoltre, la base genetica del cancro è dimostrata dalla consistente associazione tra mutazione, ereditata o acquisita, di questi geni, con forme o sindromi cancerose specifiche.

Nel caso delle sindromi da cancro, un singolo gene mutante può predisporre gli individui a più tipi di tumore, ma l'analisi clinica nei confronti di più generazioni di famiglie numerose indica che, mentre alcuni tipi di tumore possono essere condivisi dalle famiglie più colpite, la manifestazione di altri varia da una famiglia all'altra.

La ricerca sull'origine di questa variabilità, attraverso analisi dettagliate delle mutazioni in diversi di questi geni, ha rivelato importanti correlazioni tra tipi particolari di tumore, osservati in ciascuna famiglia, e tipo e localizzazione della mutazione, all'interno del gene responsabile. L'identificazione degli oncogeni e dei geni soppressori tumorali coinvolti nei tumori sporadici ed ereditari ha stimolato lo sviluppo di un approccio molecolare alla diagnosi, alla prognosi e al trattamento del cancro.

Attualmente, il principale vantaggio apportato da queste ricerche al paziente affetto da cancro consiste nelle possibilità di previsione e diagnosi che, in alcuni casi, hanno portato a strategie d'intervento più razionali e tempestive e meno invasive. È anche possibile che una diagnosi più precoce del cancro, tramite l'analisi molecolare, possa portare, per alcuni tipi di tumore, a una più alta frequenza di successo nella cura con i trattamenti attualmente disponibili.

Diviene chiaro come lo screening genetico sia di importanza fondamentale, infatti se condotto adeguatamente può consentire di ridurre del 60% il numero di pazienti da sottoporre ad indagini clinico-strumentali con evidenti benefici economici e psicologici. Inoltre poter mettere in relazione i dati ottenuti dai test genetici a sindromi specifiche ci permette di intervenire sui tre momenti clinici fondamentali per questi pazienti: diagnosi, trattamento, follow-up.

L'attenzione è rivolta soprattutto al ruolo del gene PTEN nella oncogenesi degli MPM e alla sua principale funzione di oncosoppressore raggiunta nella DOWN-REGULATION dell'oncogeno Akt/PKB.

Scoperto nel 1997 come oncosoppressore localizzato su cromosoma 10q23, PTEN (Phosphatase and tensin homologue) codifica per una fosfatasi a doppia specificità che defosforila sia substrati proteici che PIP3.

In questo modo essa inibisce la via di attivazione di AKT, qui esplicata:

- PI3K converte il PIP2 in PIP3,
- PIP3 lega i domini PH (Pleckstrin Homology) delle chinasi AKT e PDK1. PDK1
- fosforila AKT, attivandola.

AKT svolge svariate funzioni:

- 1) Stimola la proliferazione;
- 2) Stimola la sopravvivenza cellulare inducendo trascrizione di MDM2 e inibendo quella di fattori proapoptotici;
- 3) Stimola la sintesi di proteine e ipertrofia cellulare;
- 4) Attiva una chinasi chiamata mTOR (mammalian Target Of Rapamicin), che è inibita dalla rapamicina, un prodotto di un batterio originario dell'isola Rapa Nui.

La perdita di funzione del gene PTEN predispone a un gruppo di malattie definite “sindromi tumorali amartomatose associate a PTEN”, tra cui la sindrome di Cowden, che predispone a carcinoma di tiroide, mammella, cervello, endometrio e polipi amartomatosi del tratto gastro-intestinale.

Paziente	S/F	età	insorgenza	mutazione	manifestazioni cliniche	referenza
PHTS1	F	53a		c.406T->C; p.136Cys>Arg	BRRS: macrocefalia, acantosi glicogenica, asimmetria lobi frontali, polipi amartomatosi gastrici, tumore colon, macchie genitali, keratosi delle mani e dei piedi.	BMC Med Genet. 2012 Apr 20;13:28 Hered Cancer Clin Pract. 2013 Jul 25;11(1):8.
PHTS2	S	45a		↓ mRNA	CS: polipi amartomatosi gastrici, tumore colon, acantosi glicogenica, cheratosi delle mani e dei piedi	BMC Med Genet. 2012 Apr 20;13:28
PHTS3	S	54a		↓ mRNA	CS: polipi amartomatosi del colon, tumore colon, rene a ferro di cavallo	BMC Med Genet. 2012 Apr 20;13:28
PHTS4	F	10a		c.320A->T; p.107Asp->Val	CS: polipi amartomatosi del colon, tiroidite di Hashimoto, malformazioni artero-venose, cheratosi facciale	Hered Cancer Clin Pract. 2013 Jul 25;11(1):8.
PHTS5 ?	S	80a		↓ mRNA	tumore colon, feocromocitoma, macrocefalia	Hered Cancer Clin Pract. 2013 Jul 25;11(1):8.

F: familiare
S: sporadico

3. Materiali e metodi

Tale ricerca associa uno studio citogenetico al normale trattamento chirurgico , volto all'individuazione di un fenotipo MPM che coinvolga mutazione di Kras e perdita di funzione di PTEN.

In una coorte di 167 pazienti di età compresa tra i 40 ed i 75 aa , in cura presso il Dipartimento Universitario di Scienze Biomediche Avanzate dell'Università degli Studi di Napoli "FedericoII" – Area Funzionale di Chirurgia Generale dal 2007 al 2017 di cui 37 con K Colon e K Colon-Retto (sincroni o metacroni) , 35 con K Colon- Retto e K in altre sedi (sincroni o metacroni) e 95 con K Colon che non hanno sviluppato un secondo tumore nonostante l'ipo-espressione di PTEN

Di questi pazienti sono stati raccolti a livello anamnestico l'età, il sesso, la posizione e l'intervallo di tempo tra l'inizio del primo e il secondo tumore nonché la sopravvivenza a 5 anni dalla diagnosi e la descrizione delle procedure chirurgiche effettuate su ciascun sito oncologico.

[Tab 1-2].

Inoltre sono stati prelevati campioni biotici di tessuto Colon-rettale (mucosa sana, tumore e/polipo) e campioni di sangue periferico.

DNA, RNA e proteine (sieriche e leucocitarie) vengono estratti dai campioni di sangue periferico (3 ml di sangue periferico, circa $5-7 \times 10^3/\text{mL}$ cellule) e dalle biopsie,

utilizzando il reagente Qiazol (QIAGEN) e si effettua un'analisi molecolare, tramite tecnica G-banding, per ricercare la perdita di funzione del gene PTEN su tutti gli esoni.

L'analisi molecolare del gene PTEN viene effettuata mediante amplificazione per PCR (Polymerase Chain Reaction) di tutti gli esoni dei geni PHTS, comprese le sequenze di giunzione introne-esone, seguita da sequenziamento diretto con metodo di Ranger di tutti i prodotti di amplificazione.

L'analisi quantitativa dei messaggeri del gene PTEN è eseguita mediante Real Time PCR. L'espressione relativa è calcolata con il metodo comparativo del Ct. I saggi sono eseguiti utilizzando l'apparecchio iCycler iQ Real Time Detection System BIO-RAD.

Per ciascun campione viene anche effettuata l'analisi mediante Western Blot: circa 20-50 g di proteine totali saranno analizzati mediante SDS-poliacrilammide gel-elettroforesi e trasferito su una membrana di nitrocellulosa Amersham Hybond-ECL (Amersham, GE sanitaria, USA). Tali proteine sono poi ibridizzate con un anticorpo primario specifico per la proteina PTEN.

L'analisi statistica è effettuata mediante test t di Student, utilizzato per confrontare le medie delle variabili continue. Le associazioni genotipo-fenotipo sono analizzate mediante regressione logistica univariata e multivariata con il software SPSS. I dati sono espressi come media delle deviazioni standard.

4. Risultati

In tutti i casi esaminati sono stati ottenuti risultati preliminari.

Dei 37 pazienti con K Colon + K Colon Retto:

- 29 pz (16 M e 13 F) presentavano neoplasie sincrone.
- 8 pz (5 M e 3 F) presentavano neoplasie metacrone.

[Tab 1 – Tab 2]

Tab 1. Pazienti con K-Colon + K Colon Retto

	Maschi	Femmine	Totale MPM K-Colon + K- Colon Retto
Neoplasie Metacrone	5	3	8
Neoplasie Sincrone	16	13	29
Totale pazienti	21	16	37

Tab 2: MPM - CCR SINCRONI E METACRONI [37 CASI]

CCR	PZ	M	F	Età	Sop. > 5 aa
Simultanei	29 (78%)	16	13	47-82	58%
- colon sn + retto	16 (51%)	9	7		
- colon dx + colon sx-retto	9 (37%)	5	4		
- colon dx + fless sple +sigma	4 (12%)	2	2		
Metacroni	8 (22%)	5	3		44%

Ciò conferma che statisticamente il sesso non ha incidenza sulla comparsa di una neoplasia sincrona o metacrona.

Nel 56,7% dei casi osservati (21 casi/ 37) è stata osservata una diminuita espressione del gene PTEN

Nel 2,7% dei casi osservati (1 caso/ 37) non è stata osservata alcuna espressione.

Nel 40,5% dei casi osservati (15 casi/ 37) è stata osservata una normale espressione del gene PTEN [Tab2]

Tab 2. Espressione Gene PTEN

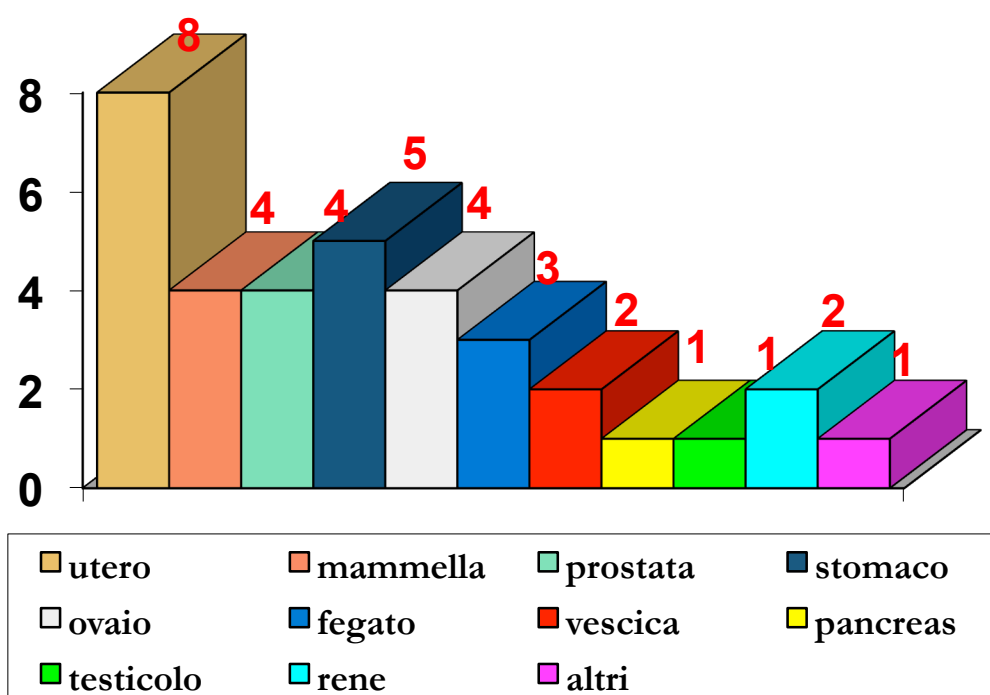
	N° Pazienti / 90	%
No Espressione Gene PTEN	1	2,7
Ipo Espressione Gene PTEN	21	56,8
Normale Espressione Gene PTEN	15	40,5
TOT	37	100

Dalla prima parte dello studio emerge che un'ipo-espressione o la mancata espressione del gene PTEN predispone in circa il 60% dei casi ad un secondo tumore nella medesima sede.

Nessuna correlazione invece è stata trovata tra l'espressione di PTEN ed altre caratteristiche cliniche ed istopatologiche tra cui l'età, il sesso, la forma, la localizzazione, il grado.

Nel gruppo dei 35 pazienti con K Colon Retto + K in altre sedi [Tab 3]:

Tab3: MPM- CCR ed in alter sedi



- 17 pz (10 M e 7 F) presentavano neoplasie sincrone.
- 18 pz (11 M e 7 F) presentavano neoplasie metacrone.

[Tab4]

Tab 4. Pazienti con K-Colon + K in altre sedi

	Maschi	Femmine	Totale MPM K-Colon + K- altre Sedi
Neoplasie Metacrone	11	7	18
Neoplasie Sincrone	10	7	17
Totale pazienti	21	14	35

Nel 54,3% dei casi osservati (19 casi/ 35) è stata osservata una diminuita espressione di PTEN.

Nel 8,6% dei casi osservati (3 casi/ 35) non è stata osservata alcuna espressione.

Nel 37,1% dei casi osservati (13 casi/ 35) è stata osservata una normale espressione del gene PTEN [Tab4]

Tab 4. Espressione Gene PTEN

	N° Pazienti / 115	%
No Espressione Gene PTEN	3	8,6
Ipo Espressione Gene PTEN	19	54,3
Normale Espressione Gene PTEN	13	37,1
TOT	35	100

Anche nella seconda parte dello studio emerge con chiarezza che la ipo-espressione di PTEN o la sua mancata espressione predispone nel 63% dei casi allo sviluppo di un secondo tumore in una sede differente dalla localizzazione primaria.

La perdita di PTEN è stata associata con le dimensioni del tumore e lo stadio TNM avanzata.

Età, sesso , localizzazione del tumore , stato linfonodale e distanti metastasi dei pazienti non correlano con il livello di espressione di PTEN.

Abbiamo poi analizzato un terzo gruppo di pazienti non affetti da MPM, ovvero pazienti che nonostante la diminuita espressione del gene PTEN o la sua mancata espressione non ha sviluppato un secondo tumore.

Nel gruppo dei 95 pazienti con K Colon Retto e nessun secondo tumore:

- 16 pz (9 M e 7 F) non presentavano espressione del gene PTEN.
- 79 pz (46 M e 33 F) presentavano diminuita espressione del gene PTEN. [Tab3]

In definitiva:

	Ipo Espressione Gene PTEN	No Espressione Gene PTEN	Normale Espressione Gene PTEN	TOT
Pz K-Colon / No 2° Neoplasia	79	16	/	95
Pz K-Colon + K Colon-Retto	21	1	15	37
Pz K-Colon + K sede diversa	19	3	13	35
Tot	119	20	28	167

Dallo Nostro Studio retrospettivo emerge che dei 139 pazienti aventi ipo o mancata espressione del gene PTEN solo 44 (pari al 31,6%) dei pazienti sviluppa un tumore sincrono o metacrono.

Dato altresì interessante è che 95 pazienti dei 139 (pari al 68,4%) pur avendo un ipo o mancata espressione di PTEN non sviluppa un secondo tumore.

Questo conferma che la diminuita espressione del gene PTEN predispone ad un possibile MPM ma non indica con certezza lo sviluppo di una possibile neoplasia sincrona o metacrona

5. Discussione

Approfondimenti sul ruolo delle mutazioni del gene PTEN rappresentano un avanzamento potenzialmente importante in oncologia molecolare e lo stato dei tumori associati a PTEN sembra essere di importanza fondamentale per determinare e monitorare il trattamento di una serie di neoplasie quando deve essere mirato il meccanismo molecolare di PTEN per l'intervento terapeutico utilizzando agenti farmacologici nuovi e/o esistenti.

Il riconoscimento di numerose mutazioni in differenti livelli di questo gene può rendere possibile una correlazione tra il genotipo, ottenuto dai test genetici, e l'espressione fenotipica, talora alquanto eterogenea in queste sindromi, ciò può ulteriormente influenzare il clinico, fornendo informazioni prognostiche determinanti.

Infatti con l'osservazione di una spiccata eterogeneità genetica, e soprattutto della correlazione genotipo-fenotipo, che in alcune di queste sindromi ha un'importanza rilevante nel predire l'insorgenza di MPM si è ipotizzato di poter associare le informazioni ottenute con l'analisi genetica a sindromi già codificate e/o a comportamenti

particolarmente aggressivi e poter così variare l'approccio clinico, diagnostico e terapeutico a seconda delle informazioni fornite dal genetista.

Da qui l'idea di una "Chirurgia genetica" che rappresenta la possibilità di curare una neoplasia sulla base di interventi di ingegneria genetica e che raffigura il prossimo futuro, mentre una "Chirurgia DNA guidata" è già, grazie a studi come questo, una realtà concreta ed è sempre più richiesta nella programmazione del trattamento più appropriato delle sindromi ereditarie.

Nell'ultimo decennio, con la crescita della tecnologia per il sequenziamento del Dna e l'abbattimento dei costi, la comprensione del genoma umano ha fatto passi da gigante. Tuttavia, gli scienziati hanno ancora serie difficoltà a modificare i geni direttamente all'interno di una cellula vivente. Oggi grazie all'introduzione di nuovi strumenti d'ingegneria genomica la speranza ha preso la forma in particolare grazie ad un sistema chiamato **CRISPR**.

Il CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) è una tecnica che permette di rimpiazzare le proteine del DNA scelte come obiettivo con una breve sequenza di RNA che è ospitata in particolari geni. A differenza delle proteine complesse, l'RNA – che

ha quasi la stessa struttura semplice del DNA – può venire prodotto facilmente in laboratorio;

Nel 2012, Emmanuelle Charpentier, un microbiologo clinico esperto di patogenesi all'Helmholtz Centre for Infection Research, e Jennifer Doudna, consulente dell'University of California, a Berkeley, hanno dimostrato la possibilità di utilizzare un singolo RNA insieme a un “bisturi” proteico, l'enzima Cas9, per frammentare qualsiasi sequenza di DNA su cui lavorare in provetta. Nel gennaio 2013 George Church, un genetista dell'Harvard Medical School, ha riferito che il binomio CRISPR/Cas9 si può utilizzare per l'editing genetico nelle cellule animali, incluse quelle umane.

Questa tecnologia potrebbe permettere ai ricercatori di effettuare interventi di microchirurgia sui geni, modificando semplicemente e con grande accuratezza una sequenza di DNA in un punto preciso di un cromosoma. Insieme a una tecnica di nome TALEN, inventata diversi anni fa, e a un sistema ancora precedente basato su molecole che funzionano da bisturi, le cosiddette nucleasi a dito di zinco, CRISPR potrebbe estendere il campo di applicazione delle terapie geniche.

Numerosi sono gli interrogativi sul tipo di terapia più appropriata: se iper-radicale per ciascun organo in caso di neoplasie tipicamente multifocali o se più conservativo associato ad un follow-up rigoroso.

La chirurgia profilattica, ossia la rimozione di un organo prima della trasformazione maligna o con cancro in situ, ha assunto un ruolo di primo piano per quelle malattie la cui alterazione biomolecolare sia nota, come le sindromi neoplastiche ereditarie.

Le associazioni di neoplasie in più distretti dell'organismo obbligano ad un follow-up rigoroso e pluridistrettuale.

La conoscenza di specifiche mutazioni genetiche può indirizzare a schemi di sorveglianza clinico-strumentale personalizzati, selezionando i pazienti in base alle alterazioni a rischio e riservando loro di conseguenza le indagini idonee. La soppressione della crescita di cellule tumorali maligne è stata realizzata in sistemi sperimentali mediante manipolazione genetica, per esempio tramite la sostituzione di geni soppressori tumorali, l'inibizione di oncogeni attivati, l'interferenza con processi di angiogenesi e metastasi e l'aumento dell'immunogenicità delle cellule tumorali.

6. Conclusione

I progressi recenti nello sviluppo di metodi per indirizzare molecole e cellule verso organi specifici, mediante peptidi selezionati in vivo, indicano che questi ostacoli saranno superati nel prossimo futuro. La conoscenza dei meccanismi biomolecolari può portare ad adottare misure farmacologiche preventive per inibire e/o limitare la proliferazione neoplastica.

Ci auguriamo che un progresso delle conoscenze epidemiologiche ed etiopatogenetiche, auspicabile nell'immediato futuro e l'analisi di casistiche ampie potranno consentire la schematizzazione e l'identificazione di categorie di pazienti con differenti e specifiche implicazioni prognostiche con lo sviluppo di programmi di prevenzione e follow-up mirati che potranno essere il punto di partenza per la realizzazione di trials prima e di nuove linee guida poi. Appare quindi evidente la rilevanza che studi di espressione molecolare possono avere sia per quanto riguarda la definizione dei meccanismi di alterazione molecolare responsabili della induzione e progressione neoplastica sia in prospettiva terapeutica.

Bibliografia

1. C. Dodaro, E. Russo, G. Spinosa *et al.*, “Sporadic Colonrectal Tumors in Multiple Primary Malignancies”, in A. Renda (Ed.). *Multiple Primary Malignancies*, Springer, Milan, 2008.
2. S. Staibano, M. Mascolo, L. Lo Muzio, G. Ilardi, L. Nugnes, C. Dodaro, A. Renda, G. De Rosa, “Multiple Primary Malignancies and HPV”, in A. Renda (Ed.). *Multiple Primary Malignancies*, Springer, Milan, 2008.
3. C. Dodaro *et al* “Multiple primary malignancies: “non-codified” associations” in A. Renda (Ed.). *Multiple Primary Malignancies*, Springer, Milan, 2008
4. N. Carlomagno, ML. Santangelo, R. Mastromarino, A. Calogero, C. Dodaro, A.Renda , ” Rare multiple primary malignancies among surgical patients-a single surgical unit experience”. *Ecancermedicalsecience*. 2014 Jun 18;8:438.
5. N. Carlomagno, L. Pelosio, A. Jamshidi, *et al.*, “The Hereditary Syndromes”, in A. Renda (Ed.). *Multiple Primary Malignancies*, Springer, Milan, 2008.
6. A. Borrelli, N. Carlomagno, C. Dodaro, *et al.*, “Ereditary Colorectal Cancer and Molecular Analysis”, *Tehniques in Coloproctology*, Vol. 7 – Supp.2, 2003.
7. ED Lynch, EA Ostermeyer, MK Lee, JF Arena, H Ji, J Dann, K Swisshelm, D Suchard, PM MacLeod *et al.*, “Inherited mutations in PTEN that are associated with breast cancer, Cowden disease and polyposis”, in *Am J Hum Genet* 2007;61: 1254-60
8. Peterson G.: Genetic testings for cancer: the surgeon's critical role. *J Am Coll Surg*. 2009 Jan;188(1):89-93
9. M. Kowalczyk, M. Srebniak, A. Tomaszewska, “Chromosome abnormalities without phenotypic consequences”. *J Appl Genet* 2009; 48:157-66
10. MK Dhaliwal, KL Satya-Prakash, PC Davis, S. Pathak, “High frequency of telomeric association in a family with multiple congenital neoplasia. *Vivo* 2004;8:1023-6
11. S Warren and O Gates “Multiple primary malignant tumors: a survey of the literature and statistical study”. *Am J Cancer* 16 1358–414
12. CGN Demante, DA Troyer and TP Miles “Multiple primary malignant neoplasm” .*Am J Clin Oncol* (2001) 26 79–83
13. I. Sansal, W. R Sellers, “The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway”. *J Clin Oncol* 22, 2954–2963 (2004).

14. M. S Song, L Salmena. & P. P Pandolfi. "The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor." *Nat Rev Mol Cell Biol* (2012)
15. O Renner, C Blanco-Aparicio, A Carnero. "Genetic modelling of the PTEN/AKT pathway in cancer research." *Clin Transl Oncol* 2008; 10: 618-27.
16. A Aydiner, A Karadeniz, K Uygun, *et al.* "Multiple primary neoplasms at a single institution: differences between synchronous and metachronous neoplasms." *Am J Clin Oncol* 2000;23:364-70.
17. I Soerjomataram, JW Coebergh. "Epidemiology of multiple primary cancers." *Methods Mol Biol.* 2009;471:85–105.
18. HT Lynch, RE Harris, PM Lynch, HA Guirgis, JF Lynch, WA Bardawil. Role of heredity in multiple primary cancer. *Cancer*.2012; 40(Suppl 4):1849–185
19. M Artac, H Bozcuk, M Ozdogan, *et al.* "Different clinical features of primary and secondary tumors in patients with multiple malignancies". *Tumori.* 2005;91(4):317–320.
20. F Albright, C Teerlink, TL Werner, LA Cannon-Albright. "Significant evidence for a heritable contribution to cancer predisposition: a review of cancer familiarity by site." *BMC Cancer.* 2012;12:138.